

DERWENT-ACC-NO: 2000-162116

DERWENT-WEEK: 200243

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Use of substances that decrease the
activity of dipeptidyl peptidase IV to increase
blood sugar levels, e.g. for treating hypoglycemia

INVENTOR: DEMUTH, H; HOFFMANN, T ; KUEHN-WACHE, K ; ROSCHE, F
; KUHN-WACHE, K

PRIORITY-DATA: 1998DE-1034591 (July 31, 1998)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	MAIN-IPC	PUB-DATE	LANGUAGE
DE 19834591 A1	007	A61K 038/55	February 3, 2000	N/A
US 20020071838 A1	000	A61K 038/47	June 13, 2002	N/A
EP 995440 A1	000	A61K 031/425	April 26, 2000	G
US 6319893 B1	000	A01N 037/18	November 20, 2001	N/A

INT-CL (IPC): A01N037/18, A61K031/425 , A61K038/00 ,
A61K038/26 ,
A61K038/47 , A61K038/55 , A61K039/395

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 19834591A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - The use of substances (I) that decrease the
activity of dipeptidyl
peptidase IV (DP IV) to increase blood sugar levels above the
glucose
concentration characteristic of hypoglycemia in the serum of
mammals.

ACTIVITY - Antidiabetic.

MECHANISM OF ACTION - Inhibitor of glucagon degradation by DP IV.

USE - (I) are useful for increasing blood sugar levels by inhibiting the degradation of glucagon (endogenous or administered) by DP IV (dipeptidyl peptidase IV) and can therefore be used for treating metabolic disorders caused by subnormal glucose levels, especially hypoglycemia associated with diabetes.

ADVANTAGE - Only small amounts of (I) are required to protect glucagon from rapid proteolytic degradation by DP IV.

ABSTRACTED-PUB-NO: US 6319893B

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

NOVELTY - The use of substances (I) that decrease the activity of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) to increase blood sugar levels above the glucose concentration characteristic of hypoglycemia in the serum of mammals.

ACTIVITY - Antidiabetic.

MECHANISM OF ACTION - Inhibitor of glucagon degradation by DP IV.

USE - (I) are useful for increasing blood sugar levels by inhibiting the degradation of glucagon (endogenous or administered) by DP IV (dipeptidyl peptidase IV) and can therefore be used for treating metabolic disorders caused by subnormal glucose levels, especially hypoglycemia associated with diabetes.

ADVANTAGE - Only small amounts of (I) are required to protect glucagon from rapid proteolytic degradation by DP IV.

US20020071838A

NOVELTY - The use of substances (I) that decrease the activity of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) to increase blood sugar levels above the glucose concentration characteristic of hypoglycemia in the serum of mammals.

ACTIVITY - Antidiabetic.


MECHANISM OF ACTION - Inhibitor of glucagon degradation by DP IV.

USE - (I) are useful for increasing blood sugar levels by inhibiting the degradation of glucagon (endogenous or administered) by DP IV (dipeptidyl peptidase IV) and can therefore be used for treating metabolic disorders caused by subnormal glucose levels, especially hypoglycemia associated with diabetes.

ADVANTAGE - Only small amounts of (I) are required to protect glucagon from rapid proteolytic degradation by DP IV.

----- KWIC -----

Document Identifier - DID (3):
EP 995440 A1

(19)  Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 995 440 A1

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
26.04.2000 Patentblatt 2000/17

(51) Int Cl.7: A61K 31/425

(21) Anmeldenummer: 99115236.4

(22) Anmeldetag: 02.08.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

- Hoffmann, Torsten, Dr.
06120 Halle/Saale (DE)
- Kühn-Wache, Kerstin
06120 Halle/Saale (DE)
- Rosche, Fred, Dr.
06120 Halle/Saale (DE)

(30) Priorität: 31.07.1998 DE 19834591

(71) Anmelder: Probioldrug Gesellschaft für
Arzneimittelforschung mbH
06120 Halle/Saale (DE)

(74) Vertreter:
Forstmeier, Dietmar, Dr. rer. nat., Dipl.-Chem. et
al
Boeters & Bauer,
Bereliteranger 15
81541 München (DE)

(72) Erfinder:
• Demuth, Hans-Ulrich, Dr.
06120 Halle/Saale (DE)

(54) Verfahren zur Stigerung des Blutglukosespiegels in Säugern

(57) Die Erfindung beinhaltet die Verwendung von
aktivitätsmindernden Effektoren der Dipeptidyl Peptida-
se (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut
eines Säugers zur Senkung des Blutzuckerspiegels in
Säuger-Organismen.

Erfindungsgemäß eingesetzte Effektoren sind z.B.
DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipep-
tidmimetika Alanyl-Pyrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid so-
wie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hy-
droxylamin oder deren Salze, insbesondere deren Fu-
marate.

EP 0 995 440 A1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von aktivitätsmindernden Effektoren das endogene (oder zusätzlich exogen verabreichte) glycogenolytisch wirksame Peptid Glucagon oder dessen Analoga durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieses Peptidhormons bzw. seiner Analoga verringert bzw. verzögert wird.

[0002] In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität des (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Glucagons und seiner Analoga, die damit vermehrt für die glycogenolytische Stimulierung der Glucagon-Rezeptoren von insbesondere Leberzellen zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeitsdauer von körpereigenem Glucagon, was eine Stimulierung des katabolen Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

[0003] Als Resultat steigt der Blutzuckerspiegel über die für Hypoglycaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie hypoglycaemische Zustände, die die Folge verminderter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

[0004] Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind (Kirschke *et al.*, 1995; Kräuslich & Wimmer, 1987). Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden (Gomez *et al.*, 1988; Ansorge *et al.*, 1991).

[0005] Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für Prolinspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert (Yaron & Nalder, 1993; Walter *et al.*, 1980; Vanhooft *et al.*, 1995). Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt (Kessler, 1982).

[0006] Enzyme, die hochspezifisch strukturverändernd auf Prolinhaltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophillin u.a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist (Ishiura *et al.*, 1990; Hagen *et al.*, 1990).

[0007] Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen können wie strukturanaloge Prolinhaltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alaninhaltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen (Dodge & Scheraga, 1996).

[0008] DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Aufgrund dieser Spaltstellspezifität wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym bzw. Analoga an der Regulation von Polypeptiden *in vivo* beteiligt sind (Vanhooft *et al.*, 1995).

[0009] Zu geringe Blutzuckerkonzentrationen können im menschlichen und tierischen Organismus zu pathologischen Zuständen führen. Insbesondere nach Unfällen kann es zu einem sogenannten hypoglycaemischen Schock kommen, was bei Patienten zu Heißhunger, Schweißausbrüchen, ja sogar zu Bewußtlosigkeit und Tod führen kann.

[0010] Es war daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säugerorganismen wie akuter oder chronischer Hypoglycaemie bereitzustellen.

[0011] Insbesondere war es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel bereitzustellen, mit denen Kohlehydratreserven zum Beispiel der Leber rasch mobilisiert werden können.

[0012] Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Verwendung von aktivitätsmindernden Effektoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels in einem Säugerorganismus gelöst.

[0013] Es ist bereits bekannt, aktivitätsmindernde Effektoren der DP IV zur Erniedrigung des Blutzuckerspiegels von Säuger-Organismen einzusetzen. Dabei wird der Abbau von Incretinen, die den Glucoseabbau stimulieren, durch DP IV gestoppt.

[0014] Es ist daher besonders überraschend, daß aktivitätsmindernde Effektoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels eingesetzt werden können. Vermutlich beruht diese Wirkung auf folgenden Mechanismen:

[0015] Beim Glucosemetabolismus und -katabolismus im menschlichen und tierischen Körper kann

grundsätzlich zwischen zwei Phasen unterschieden werden:

[0016] 1. In der ersten Phase werden nach der Nahrungsaufnahme vermehrt Incretine ausgeschüttet (d.h. Hormone, die die Insulinsekretion des Pankreas stimulieren, wie Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆)), wodurch es zu einer vermehrten Insulinproduktion und in kausaler Folge zu einem verstärkten Abbau der durch Nahrungsaufnahme zugeführten Glucose kommt.

[0017] Die Incretine sind jedoch Substrate der DP IV, da diese von den N-terminalen Sequenzen der Incretine die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in situ* abspalten kann (Mentlein *et al.*, 1993). Folglich kommt es bei Vorliegen von DP IV zu einem Abbau der Incretine, was wiederum zu einem verminderten Glucoseabbau führt.

[0018] Durch die Inhibierung der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität *in vivo* ist es daher möglich, einen übermäßigen Abbau der Incretine wirksam zu unterdrücken und folglich den Glucoseabbau zu steigern:

- Die DP IV-Inhibierung führt zur Stabilisierung der Incretine,
- die verlängerte Lebensdauer der Incretine im Blutkreislauf verstärkt ihre insulinotrope und insulinensitivierende Wirkung,
- die damit erhöhte und wirksamere Insulinausschüttung zieht eine verstärkte Glukosetoleranz nach sich, (Demuth *et al.*, 1996).

[0019] An diabetischen Ratten wurde nachgewiesen, daß die entsprechenden DP IV-Inhibitoren zur Modulation des dargestellten Regelkreises wirkungsvoll eingesetzt werden können (Pederson *et al.*, 1998). Diese Phase dauert vom Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme an etwa 120 Minuten.

Nach Ablauf dieser sogenannten postprandialen Phase wird die Sekretion von Incretinen gestoppt und bereits vorhandene Incretine durch DP IV abgebaut. Dadurch sinkt die Insulinproduktion, was zu einem Ende des Glucoseabbaus führt.

[0020] 2. Um die physiologisch notwendige Glukosekonzentration von etwa 5,5 mM zwischen den Nahrungsaufnahmen aufrecht zu erhalten, wird in der zweiten Phase eingelagertes Glykogen abgebaut, wozu Glucagon aus den pankreatischen A-Zellen freigesetzt wird. Glucagon weist also eine entgegengesetzte Wirkung zum Insulin und damit auch zu den Incretinen auf.

[0021] Bei täglich drei Mahlzeiten steht der menschliche Körper demgemäß ca. 6 Stunden (3 x 120 Minuten) unter GLP-1/GIP- und Insulin-, aber 18 Stunden unter Glucagon-Kontrolle.

[0022] Es ist festgestellt worden, daß DP IV endogen aus den selben sekretorischen Granulae der A-Zellen ausgeschüttet wird wie Glucagon und daß diese Aus-

schüttung zeitgleich mit der Glucagon-Ausschüttung bzw. dem Eintritt der Glucagon-Wirkung erfolgen kann. Erfindungsgemäß ist nun gefunden worden, daß Glucagon *in vitro* wie *in vivo* durch DP IV bzw. DP IV-analoge Enzymaktivität abgebaut und damit deaktiviert wird, vergleiche Abb. 1, wodurch die Freisetzung von Glykogen und folglich von Glukose verlangsamt bzw. gestoppt wird: Diese Tatsache war vollkommen überraschend, da man bisher annahm, daß DP IV - wie vorstehend ausgeführt - nur eine Senkung des Blutzuckerspiegels bewirkt.

[0023] Damit eröffnet sich erfindungsgemäß die Möglichkeit, durch Beeinflussung der DP IV-Aktivität bzw. analoger Aktivitäten die Freisetzung endogener Speicherglucose aus Glykogen mittels Glucagon zu befördern; eine gleichzeitige Stimulierung des Glukoseabbaus erfolgt nicht, da im menschlichen Organismus ca. 2 Stunden nach den Mahlzeiten keine Incretine sekretiert werden.

[0024] Der Erfindung liegt also der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität eine Stabilitätserhöhung von extern zugeführtem oder endogen zirkulierendem Glucagon zur Folge hat, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Proteine der Glucagon-Abbau im Blut kontrolliert werden kann;
2. es durch die Stabilitätserhöhung des endogen zirkulierenden oder extern zugeführten Glucagons zu einer kontrollierbaren Modulation des Blut-Glukosespiegels kommt.

[0025] Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels über die für Hypoglycaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus hinaus.

[0026] Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung bzw. Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen. Eine derartige Anomalie kann z.B. eine akute oder chronische Hypoglycaemie sein, bei der es nötig ist, rasch Kohlehydratreserven der Leber zu mobilisieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung bzw. ein Verfahren zur Steigerung des Blutzuckerspiegels über die für Hypoglycaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Dazu kann man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge eines Effektors der DP IV- bzw. der DP IV-ana-

logen Enzymaktivität verabreichen.

Ein bedeutender Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die geringe Belastung des Organismus, da, wenn überhaupt, nur geringe externe Hormongaben verabreicht werden müssen: Erfindungsgemäß wird der Glucagonabbau durch die Verwendung der erfindungsgemäßen DP IV-Inhibitoren gebremst oder vollständig abgestoppt, so daß im Organismus eines erwachsenen Menschen typischerweise eine Menge von verabreichtem oder endogen freigesetztem Glukagon von 2pM - 200 pM erhalten bleibt. Ein zu schneller proteolytischer Abbau wird verhindert.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäß eingesetzte Effektoren sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptid-derivate bzw. Dipeptidmimetika Alanyl-Pyrrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin oder deren Salze, insbesondere deren Fumarate. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt oder in Analogie zu den in der Literatur beschriebenen Methoden herstellbar (Demuth, 1990).

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Erhöhung erniedrigter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf unterdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren können in Form von pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden, die den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien und/oder üblichen Adjuvantien enthalten. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit bzw. der Schwere der Erkrankung können einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Zum Beispiel kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolididen ein solcher Dosisbereich zwischen 0.1 mg und 10 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen. Vorzugsweise werden die Effektoren jeweils ca. 120 Min. nach der Nahrungsaufnahme verabreicht. Die Effektoren können auch zusammen bzw. in kurzen zeitlichen Abständen mit Glucagon oder dessen Analogas eingesetzt werden.

Beispiel 1: Hemmung der Serum-DP IV- katalysierten Glucagonspaltung durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid

5 Siehe Abbildung 1

Beispiel 2: Effekt von Glucagon auf die endogene Glukose-freisetzung nach Inkubation in Plasma von DP IV-positiven und DP IV-negativen Ratten

10 [0027] Um zu prüfen, ob die Glucagon-abbauende Aktivität im Plasma von DP IV-negativen Ratten vorhanden ist, wurden 6.8 µg Glucagon für drei Stunden bei 37 °C in 1.0 ml Plasma normaler, DP IV-positiver, Ratten und in 1.0 ml Plasma DP IV-negativer Ratten vorinkubiert. 10 - 50 µl der Inkubationslösung wurden normalen Wistar Ratten i.v. injiziert und mit einer Salzkontrolle verglichen. Die biologische Antwort - d.h. die Zunahme der Blutglukose durch die Glucagon-stimulierte hepatische Glukose-Freisetzung wurde 60 min verfolgt (Abbildung 3).

15 *Beispiel 3: Effekt von Glucagon auf die Glukose Antwort in Wistar Ratten nach i.v. Injektion von vorinkubiertem Glucagon im Plasma einer normalen Ratte, in Gegenwart und Abwesenheit von DP IV-Inhibitor*

20 [0028] Um zu prüfen, ob der Effekt der Glucagon-abbauenden Aktivität in Plasma durch einen spezifischen DP IV-Inhibitor inhibiert werden kann, wurden 6.8 µg Glucagon für drei Stunden bei 37°C in 1.0 ml normalen Ratten Plasma und in 1.0 ml normalem Ratten-Plasma, das zusätzlich 0,01 mM Isoleucyl-Thiazolidid enthält, induziert. 10 - 50 µl der Inkubationslösung wurden normalen Wistar Ratten i.v. injiziert und mit einer Salzkontrolle verglichen. Die biologische Antwort - d.h. die Zunahme der Blutglukose durch die Glucagon-stimulierte hepatische Glukose-Freisetzung wurde 30 min verfolgt (Abbildung 4).

40 Literaturverzeichnis

[0029]

- 45 Ansorge, S., Schön, E., and Kunz, D. (1991). Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications. *Biomed. Biochim. Acta* 50, 799-807.
Demuth, H.-U. (1990) Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-280.
50 Demuth, H.-U., Rosche, F., Schmidt, J., Pauly, R. P., McIntosh, C.H.S. and Pederson, R.A. (1996). Verfahren zur Steigerung des Blutglukosespiegels in Säugern.
DE 196 16 486.
Dodge, R.W. & Scheraga, H.A. (1996). Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry*

- 35, 1548-1559.
Gomez, S., Gluschankof, P., Lepage, A., and Cohen, P. (1988). Relationship between endo- and exopeptidases in a processing enzyme system: activation of an endoprotease by the aminopeptidase B-like activity in somatostatin-28 convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5468-5472.
- Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C.E., Stein, H., and Fleischer, B. (1990). The T cell triggering molecule Tp 103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J. Immunology* 144, 2908-2914.
- Ishihara, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata, K., and Sugita H. (1990). Identification of a putative amyloid A4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase *FEBS-Letters* 260, 131-134.
- Kräusslich, H.-G. and Wimmer, E. (1987). Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701
- Kessler, H. (1982). Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509-520.
- Mentlein, R., Gallwitz, B., and Schmidt, W.E. (1993). Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829-835.
- Pederson, R.A., White, H.A., Schlentzig, D., Pauly, R.P., McIntosh, C.H.S., and Demuth, H.-U. (1998). Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats treated by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucyl thiazolidide. *Diabetes* 47, 1253-1258.
- Vanhooft, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., and Scharp, S. (1995). Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal*, 9 736-744.
- Walter, R., Simmons, W.H., and Yoshimoto, T. (1980). Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111-127.
- Yaron, A. and Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28(1), 31-38.
- Kirschke, H., Barrett, A.J., Rawlings, N.D. (1995). Proteinases 1: Lysosomal cysteine proteinases. *Protein profile* 2/14, S. 1581-1634
3. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels über die für Hypoglycaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum von Säuger-Organismen.
 4. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.
 5. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Effektoren zusammen mit Glucagon oder dessen Analoga eingesetzt werden.
 6. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Effektoren in einer therapeutisch wirksamen Menge eingesetzt werden.
 7. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Effektoren in Kombination mit an sich üblichen Adjuvantien und/oder Trägerstoffen eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Verwendung von aktivitätsmindernden Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels in Säuger-Organismen.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen.

EP 0 995 440 A1

Fig. 1

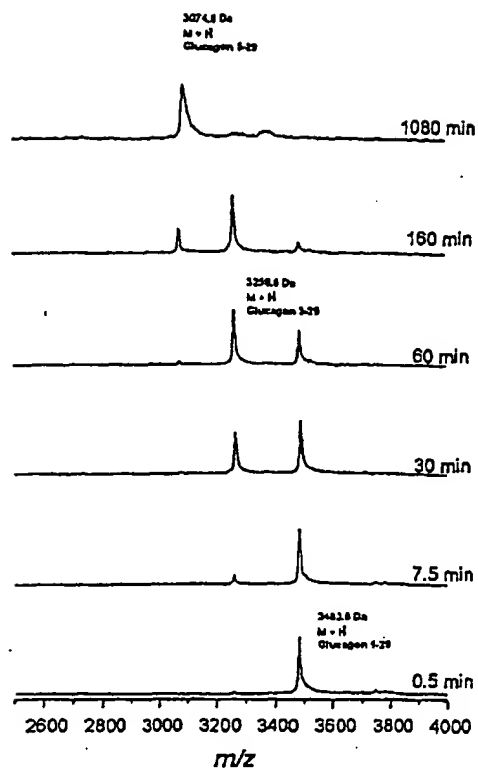


Abbildung 1: MALDI-TOF Massenspektren einer 0.14 mM Glucagonlösung in 40 mM

TRIS/HCl (pH = 7,6) in Gegenwart von 40 nM DP IV (Sequentiell erfolgt die Abspaltung der Dipeptide His-Ser und Gln-Gly in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.)

EP 0 995 440 A1

Fig. 2.

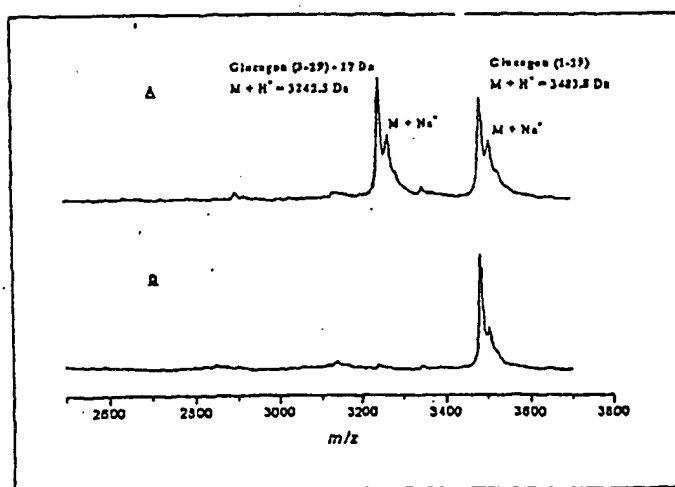


Abbildung 2: MALDI-TOF Massenspektren einer Glucagon-Serum-Mischung

A - Serum-DP IV hydrolysiert Glucagon

B - Suppression der DP IV-katalysierten Glucagonhydrolyse durch den DP-Inhibitor Iso-leucyl-Thiazolidid

EP 0 995 440 A1

Fig. 3

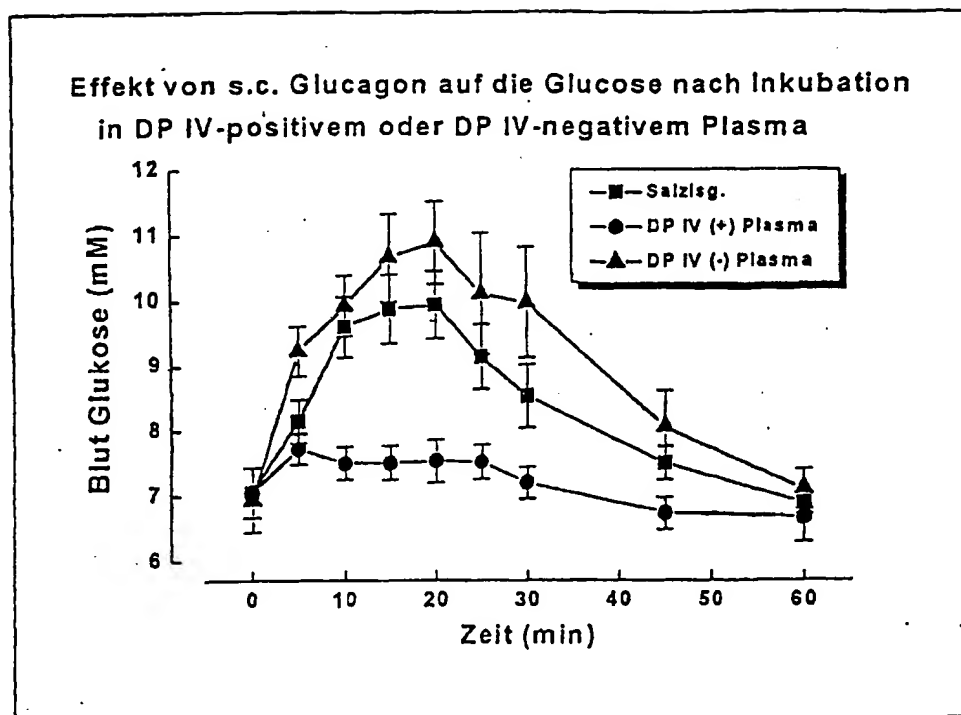


Abbildung 3: Effekt von Glucagon auf die endogene Glukose-Freisetzung in der Wistar Ratte nach i.v. Injektion von Glucagon, präinkubiert in Plasma DP IV-positiver und DP IV-negativer Ratten.

EP 0 995 440 A1

Fig. 4

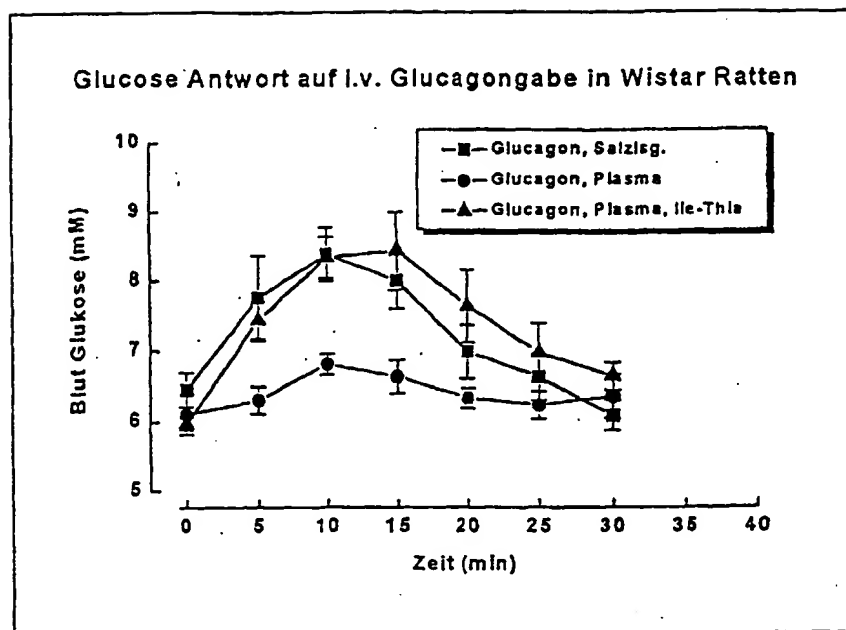


Abbildung 4: Effekt von Glucagon auf die endogene Glukose-Freisetzung in der Wistar Ratte nach i.v. Injektion von Glucagon, präinkubiert in Plasma von normalen Ratten, in Gegenwart bzw. Abwesenheit von spezifischem DP IV-Inhibitor.

EP 0 995 440 A1



Europäisches EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Patentamt

 der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
 übereinkommens für das weitere Verfahren als
 europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 99 11 5236

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	WO 97 40832 A (PAULY ROBERT P ; PEDERSON RAY A (CA); MCINTOSH CHRISTOPHER H S (CA)) 6. November 1997 (1997-11-06) * Zusammenfassung; Ansprüche 1-4; Beispiel 3 *	1-4	A61K31/425
X	WO 98 19998 A (CIBA GEIGY AG ; VILLHAUER EDWIN BERNARD (US)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) * Zusammenfassung *	1-4	
P, X	EP 0 869 135 A (LILLY CO ELI) 7. Oktober 1998 (1998-10-07) * Zusammenfassung * * Seite 3, Zeile 2-19 *	1-4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			A61K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPÜ in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		27. Januar 2000	
		Prüfer	
		A. Jakobs	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
<p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet. Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund D: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur</p> <p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 (3-97) (p.0008)

EP 0 995 440 A1

Europäisches
PatentamtUNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT CNummer der Anmeldung
EP 99 11 5236

Vollständig recherchierte Ansprüche:

Unvollständig recherchierte Ansprüche:

1-7

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Die geltenden Patentansprüche 1-7 beziehen sich auf eine Verwendung/Verbindung, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich Dipeptidyl peptidase IV Effectoren. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 83 EPÜ nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung auch für die im Anspruch 4 genannten Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 84 EPÜ geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verwendung/Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, dass er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Produkte die spezifisch in den Beispielen genannt wurden.

EP 0 995 440 A1



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 11 5236

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (InCL17)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Beitrag Anspruch	
P, X	PEDERSON R A ET AL: "IMPROVED GLUCOSE TOLERANCE IN ZUCKER FATTY RATS BY ORAL ADMINISTRATION OF THE DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITOR ISOLEUCINE THIAZOLIDIDE" DIABETES, US, NEW YORK, NY, Bd. 48, Nr. 8, August 1998 (1998-08), Seiten 1253-1258, XP000853617 ISSN: 0012-1797 * Zusammenfassung *	1-4	
E	WO 99 61431 A (GLUND KONRAD ; KRUBER SUSANNE (DE); DEMUTH HANS ULRICH (DE); PROBIO) 2. Dezember 1999 (1999-12-02) * Zusammenfassung; Ansprüche 15-18 * * Seite 10, Absatz 2 - Seite 11, Absatz 3 * * Seite 18 *	1-7	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (InCL17)
A	STOECKEL, A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" PEPT.: CHEM., STRUCT. BIOL., PROC. AM. PEPT. SYMP., 14TH (1996), MEETING DATE 1995, 709-710. EDITOR(S): KAUMAYA, PRAVIN T. P.; HODGES, ROBERT S. PUBLISHER: MAYFLOWER SCIENTIFIC, KINGSWINFOR, UK., XP000867517 * das ganze Dokument *	1-7	

EPO FORM 103 (3.12) (InCL17)

EP 0 995 440 A1

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 99 11 5236

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 27-01-2000.
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

27-01-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9740832 A	06-11-1997	DE 19616486 A	30-10-1997
		AU 3023397 A	19-11-1997
		CA 2252576 A	06-11-1997
		CN 1216468 A	12-05-1999
		EP 0896538 A	17-02-1999
		NZ 332707 A	28-10-1999
WO 9819998 A	14-05-1998	AU 5318498 A	29-05-1998
		CZ 9901615 A	11-08-1999
		EP 0937040 A	25-08-1999
		NO 992028 A	28-04-1999
		PL 332777 A	11-10-1999
EP 0869135 A	07-10-1998	US 5981488 A	09-11-1999
WO 9961431 A	02-12-1999	DE 19823831 A	02-12-1999
		DE 29909208 U	09-09-1999
		DE 29909210 U	09-09-1999
		DE 29909211 U	23-09-1999

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang, siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82